

1次構造 → 正常3次構造
↓
中間状態 (凝集状態を形成し得る)

シャペロニンの役割の解明による効率的なタンパク質折りたたみ法の確立

研究者 田口 英樹

東京大学大学院・新領域創成科学研究科

概要

Anfinsen のドグマで知られるように、タンパク質の折れたたみは他からのエネルギーを必要としない自発的に進行するプロセスである。しかし、細胞内の多くのタンパク質の折れたたみにはシャペロンが必要である。さらには、必須のシャペロンであるシャペロニン GroEL の場合、ATP の加水分解まで必要である。はたして、シャペロニンはタンパク質の折れたたみに対していったい何をしているのだろうか。逆に、シャペロニンに折れたたみが助けられるタンパク質(基質タンパク質)の性質とはどのようなものであろうか。本研究では、シャペロニンと基質タンパク質双方をさまざまな手法で解析し、シャペロニンによるタンパク質折れたたみの全容解明を目指した。

1. シャペロニンの反応サイクル ダブルタイマー機構(文献1)

2712-2714

大腸菌のシャペロニンはダブルリング構造の GroEL と補助因子 GroES からなる分子量 90 万におよぶタンパク質複合体である。GroEL は ATP 存在下で大きく構造変化したのちに GroES と結合し、大きな空洞を形成する。その空洞には基質となる変性タンパク質が閉じ込められて、その「ゆりかご」の中で凝集の危険から免れた基質タンパク質は折れたたみを完了することが知られている。このシャペロニンの機能(GroEL と GroES の結合・解離、変性 GFP のシャペロニン空洞内での折れたたみ)を1分子イメージングで解析し、さらには ATP 加水分解活性の速度論解析なども行った結果(図1)、我々はGroELの反応サイクルは二つの独立したステップが連続して起こる「ダブルタイマーモデル」に従うことを提案した(図2)。

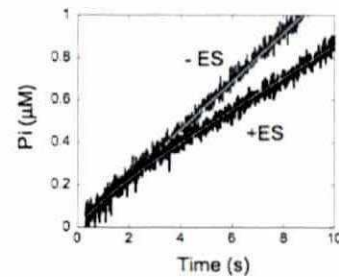


図1 GroES 存在下での GroEL の ATP 加水分解活性(リン酸結合タンパク質法)

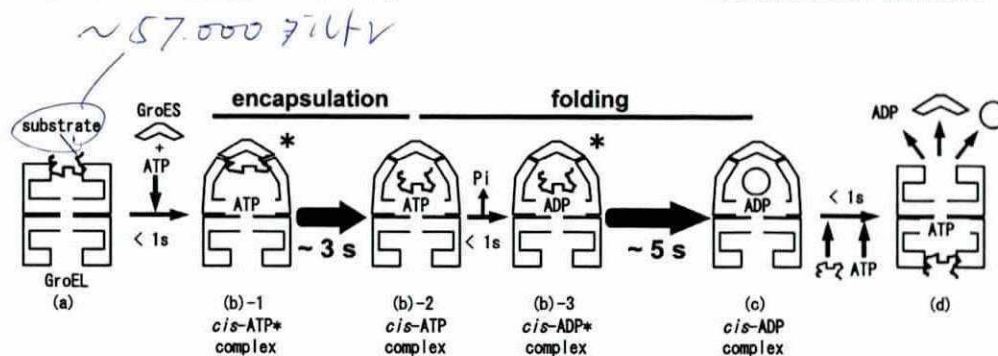


図2 シャペロニン GroEL-GroES の反応サイクルモデル

また、このサイクルにおいて基質タンパク質がどのように構造変化していくのか調べるために、シャペロニンの基質としてよく用いられる Rubisco タンパク質に部位特異的に2種類の蛍光色素を導入して分子内蛍光共鳴エネルギー解析もおこなった。

2. 基質タンパク質を空洞内に閉じ込めたシャペロニン複合体を用いた研究

(a) 基質タンパク質を閉じ込めたシャペロニン複合体は歪んでいた(文献2)。

GroEL の ATPase サイクルが変性タンパク質によって大きく加速されること、比較的大きなタンパク質の空洞内での折れたたみはかなり窮屈になることなどから、GroEL 自身が基質タンパク質の折れたたみに何らかの作用を及ぼしているのではないかと予想されている。まず、基質タンパク質を空洞に含んでいる GroEL-GroES 複合体の立体構造はどうなっているのでしょうか。好熱菌の GroEL-GroES 複合体は安定で、精製中も複合体が解離しないので、細胞内でシャペロニンの基質タンパク質を含んだまま精製できる。その立体構造を決定したところ、興味深いことに GroES が結合している GroEL の頂点ドメインだけが大きく歪んでおり、特徴的な七回対称から大きく崩れていることがわかった(図3、図の右側は基質タンパク質を含まない大腸菌の GroEL-GroES 複合体の同じ部分)。X線結晶解析では基質タンパク質の電子密度は見えていないが、生化学的な解析からは歪みの見えた GroEL リングは基質タンパク質を含んでいるので、基質タンパク質の存在が歪みを生じさせたのではないかと考えている。

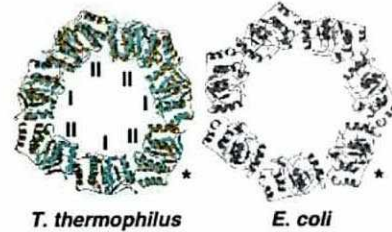


図3 好熱菌シャペロニン複合体の頂点ドメイン

(b) in vivo で空洞に入るの基質タンパク質の同定(文献2)

上記の好熱菌 GroEL-GroES 複合体には多くの種類の基質タンパク質が含まれている。そこでプロテオーム的な手法で基質タンパク質の同定を行い、シャペロニンの空洞内に入る23種類の基質蛋白質のリストを作った。

(c) 基質タンパク質を閉じ込めるのに必須の残基(文献7)

好熱菌 GroEL-GroES 複合体には大腸菌の複合体では見つけていなかった GroEL と GroES の接触部位が存在していた。この接触部位の中の保存された疎水性残基を親水性に置換した GroEL をもつ大腸菌は生育できないことから、この残基の重要性が確認できた(図4)。また、in vitro でその変異をもつ GroEL は基質タンパク質を GroEL-GroES の空洞内に閉じ込めることができないことがわかった。



図4 基質タンパク質閉じ込めに重要な GroEL(L309)の遺伝学的な解析

3. 必須因子のみからなる無細胞タンパク質合成系(PURE システム)を用いたシャペロニン GroEL の役割説明(文献4, 5)

in vitro で GroEL がタンパク質の折れたたみを助ける実験では、既に天然構造を取っているタンパク質を尿素や熱などで変性させて用いるので、翻訳後できてきた新生ポリペプチドの折れたたみのようすを調べることはできない。シャペロニンが新生ポリペプチドのフォールディングの際、どのようにはたらいっているのかを調べるために、最近開発された必須因子からなる無細胞タンパク質合成系(PURE システム)を用いた。PURE システムは通常用いられる細胞抽出液を用いた無細胞

胞タンパク質合成系とちがい、シャペロンをまったく含まない。そこで、翻訳の際に GroEL がどのように影響するかを純粋に調べることが可能である。PURE システムでさまざまなタンパク質を翻訳させたところ、GroEL-GroES があるときに可溶性が大きく上昇するタンパク質が存在した。また、これまでは、GroEL は翻訳後に折れたたみを助けると信じられてきたが、我々の結果からは、翻訳に共役して、つまりリボソームから新生ポリペプチドが解離する前から GroEL は関与して、折れたたみを助けることを見いだした(図5)。さらに、PURE システムだけでなく、大腸菌内においても GroEL は翻訳途中のリボソームに新生ポリペプチドを介して結合していることも見いだした。

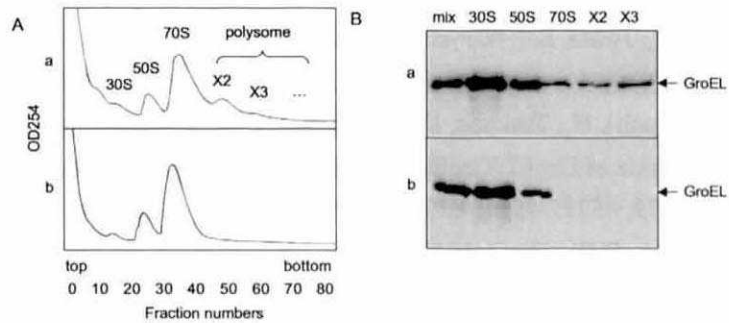


図5 PURE システムで翻訳途中のリボソームに結合した GroEL

4. まとめと今後の展望

以上のように本研究により、シャペロニン GroEL の作用機構の理解が大きく深まったと考える。特に従来あまり顧みられることがなかった基質タンパク質が存在するところで GroEL がどのようにはたらくか、構造がどうなっているのかに関して大きな進展があった。

これまで GroEL の研究は *in vitro* の研究が先行しており、細胞内で実際にどうはたらいているのかは意外なほどわかっていない。本研究で明らかになった空洞内に入る細胞内基質タンパク質のリストや新生タンパク質の折れたたみにおけるシャペロニンの役割は、今後 GroEL が細胞内でどのようにはたらいているかを知るための重要な知見になると考える。

また、本研究では十分に追究できなかったが、折れたたみが非常に困難なタンパク質がなぜシャペロニンの空洞内では折れたたむのかについて今後研究を進めていきたい。シャペロニンがないと折れたたみが進行しないように見えるタンパク質では、シャペロニンが積極的にタンパク質を「折りたたんで」いる可能性も示唆されてきている。もし、そうであるならば、シャペロニンはどのような作用を基質タンパク質に及ぼすのであろうか。今後も研究を進めていき、究極的にはシャペロニンを有効に用いて効率的なタンパク質折りたたみ法を確立したいと考えている。

文献

1. Ueno, T.*, Taguchi, H.*, Tadakuma, H., Yoshida, M., Funatsu, T. [* equally contributed] "GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism" *Mol. Cell* **14**, 423-434 (2004)
2. Shimamura, T., Koike-Takeshita, A., Yokoyama, K., Masui, R., Murai, N., Yoshida, M., Taguchi H., Iwata, S. "Crystal structure of the native chaperonin complex from *Thermus thermophilus* revealed unexpected asymmetry at the *cis*-cavity." *Structure* **12**, 1471-1480 (2004)
3. Taguchi, H., Tsukuda, K., Motojima, F., Koike-Takeshita, A., Yoshida, M. "BeF_x stops chaperonin cycle of GroEL/GroES and generates a complex with double folding chambers" *J. Biol. Chem.* **279**, 45737-45743 (2004)
4. Ying, B.W., Taguchi, H., Ueda, H., Ueda, T. "Chaperone-assisted folding of a single-chain antibody in a reconstituted translation system" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1359-1364 (2004)
5. Ying, B.-W. Taguchi, H., Kondo, M., Ueda, T. "Co-translational involvement of the chaperonin GroEL in the folding of newly translated polypeptides" *J. Biol. Chem.* **280**, 12035-12040 (2005)
6. Taguchi, H. "Chaperonin GroEL Meets the Substrate Protein as a "Load" of the Rings" (review) *J. Biochem.* **137**, 543 - 549 (2005)
7. Koike-Takeshita, A., Shimamura, T., Yokoyama, K., Yoshida, M., Taguchi, H. "Leu-309 plays a critical role in the encapsulation of substrate protein into the internal cavity of GroEL." *J. Biol. Chem.* (2005) in press

(邦文総説)

8. 小池あゆみ、田口 英樹 「分子シャペロン」(分担)in タンパク質科学—構造・物性・機能(化学同人) 印刷中
9. 田口 英樹 「シャペロニン GroEL の作用機構: ATP と変性蛋白質の役割」生物物理 印刷中
10. 田口 英樹、イン・ベイウエン、上田卓也 「翻訳時のシャペロンのはたらき」タンパク質社会学 実験医学別冊 (2005) 印刷中
11. 河田 康志、田口 英樹、吉田 賢右 「シャペロニン GroEL の作用機構」蛋白質核酸酵素 **49**, 847-852 (2004)
12. 上野 太郎、田口 英樹 「GFP1分子の折れたたみ観察から GroEL の機能を探る」実験医学 **22**, 90-91 (2004)

(招待国際会議)

1st Italian-Japanese Workshop on Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies. 2004.12.9-13, Pavia, Italy

International Symposium on Amyloidosis –Genetics, Biochemistry, Pathology and Clinical Studies. 2005.2.10-11, Kumamoto, Japan

The 13th International Congress on Genes, Gene Families and Isozymes. 2005.9.17-21, Shanghai, China